

PCT/JP98/00370

日 本 国 特 許 庁 29.01.98

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/155514

3

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D	08 APR 1998
WIPO	PCT

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 8月29日

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第234544号

出 願 人
Applicant (s):

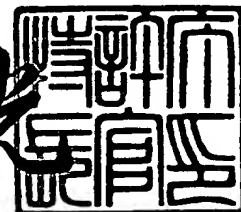
東レ株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 3月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3019597

【書類名】 特許願

【整理番号】 66A20660-A

【提出日】 平成 9年 8月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17

【発明の名称】 血小板代替物

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社基礎研
 究所内

 【氏名】 戒能 美枝

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市手広 1 1 1 1 番地 東レ株式会社基礎研
 究所内

 【氏名】 田中 利明

【特許出願人】

 【識別番号】 000003159

 【郵便番号】 103

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋室町二丁目 2 番 1 号

 【氏名又は名称】 東レ株式会社

 【代表者】 平井 克彦

 【電話番号】 03-3245-5648

【手数料の表示】

 【納付方法】 予納

 【予納台帳番号】 005186

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

特平 9-234544

【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】明細書

【発明の名称】血小板代替物

【特許請求の範囲】

【請求項1】単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物。

【請求項2】細胞外マトリックスレセプターが、遺伝子組み換え法により製造されるものである請求項1記載の血小板代替物。

【請求項3】細胞外マトリックスレセプターが、インテグリンファミリーである請求項1または請求項2記載の血小板代替物。

【請求項4】細胞外マトリックスレセプターが、インテグリン β 1ファミリーである請求項1～3記載の血小板代替物。

【請求項5】細胞外マトリックスレセプターが、インテグリン α 2 β 1である請求項1～4記載の血小板代替物。

【請求項6】細胞外マトリックスレセプターが、インテグリン α 2 β 1と免疫グロブリンのキメラ蛋白質である請求項1～5記載の血小板代替物。

【請求項7】細胞外マトリックスレセプターを担体に結合させて用いることを特徴とする請求項1～6記載の血小板代替物。

【請求項8】担体がりボソームである請求項7記載の血小板代替物。

【請求項9】止血能を有することを特徴とする請求項1～8記載の血小板代替物。

【請求項10】血小板の粘着能を代替することを特徴とする請求項1～8記載の血小板代替物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は血小板の機能的な代替物に関する。より詳細には、本発明は細胞外マトリックスレセプターの医薬用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

種々の細胞はその表面に細胞外マトリックスとの接着を媒介するレセプターを有している。これら細胞外マトリックスレセプターの一つにインテグリンスーパーファミリーに属するインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ がある。 $\alpha 2 \beta 1$ は互いに異なる膜蛋白質である $\alpha 2$ と $\beta 1$ の2つのサブユニットが非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造を持つ (Hynes, R. O. Cell 48, 549-554 (1987))。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ はVLA-2、血小板膜糖蛋白質GPIIb/IIIa複合体、ECMR1、CD49b/CD29、コラーゲンレセプターなどとも呼ばれている (細胞工学別冊「接着分子ハンドブック」p13-15、松浦成昭、高田義一 (1994)

秀潤社)。当初、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は長期間活性化したT細胞の表面に存在することが報告されたが、後に血小板や他の細胞種にも発現していることが見出された。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は、細胞外マトリックス蛋白質であるコラーゲンやラミニンなどのレセプターとして機能することが知られている。ただし、血小板や線維芽細胞の細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲンのみに結合し、血管内皮細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲン、ラミニンのいずれにも結合することが報告されており (Elices, M.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9906-9910 (1989))、細胞に依存して $\alpha 2 \beta 1$ の機能が異なると推定されている。

【0003】

病態との関連では、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は創傷治癒や癌転移に重要な役割を果たすことを示唆する報告がある (Schirow, J. A. et al. Cell 67, 403-410 (1991)、Chen, F. et al. J. exp. Med. 173, 1111-1119 (1991)、Chan, B. M. C. et al. Science 251, 1600-1602 (1991))。さらに、出血傾向を呈する患者の血小板がコラーゲンに対する反応性を欠いており、血小板機能解析から $\alpha 2 \beta 1$ が欠損していることが見出された。これによって、 $\alpha 2 \beta 1$ を介する血小板とコラーゲンの粘着が、止血・血栓形成過程の第一ステップに深くかかわっていることが示された (Nieuwenhuis, H. K. et al. Nature 318, 470-472 (1985))。この様にインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と病態との関連が示唆されてはいるが、インテグリン

ン $\alpha 2\beta 1$ 蛋白質を治療に役立てる試みは未だなされていなかった。

【0004】

一方、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ 蛋白質を単離精製し、その機能を調べる試みはすでに報告されている。血小板機能に関連の深いコラーゲンへの結合に関して、膜分画から精製したインテグリン $\alpha 2\beta 1$ 蛋白質を取り込ませたりボソームが、マグネシウムイオン濃度依存的に固相化したコラーゲンに結合することが報告されている (Staatz, W. D. J. Cell. Biol. 108, 1917-1924 (1989))。別の例では、精製された $\alpha 2\beta 1$ が金属イオン依存的に可溶性コラーゲンに結合することが示されている (Pfaff, M. et al. Eur. J. Biochem. 225, 975-984 (1994))。しかし、いずれの報告の場合も非生理的な高濃度の金属イオン存在下での結果である。また、これらの例では、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ 蛋白質を単離精製して用いているが、 $\alpha 2$ と $\beta 1$ の複合体構造は非共有結合のみで維持されており、ヘテロダイマー複合体構造は安定ではなかった。従って、生理的イオン条件下あるいは血漿成分存在下での使用を前提とするインテグリン $\alpha 2\beta 1$ 蛋白質の医薬用途は検討されていなかった。

【0005】

臨床現場では血液製剤として用いられている血小板の人工的な代替物の必要性が高まっている (医学のあゆみ 179, 406-407 (1996)、臨床血液 37, 1353-1361 (1997))。この様な血小板代替物を作る試みとして、ヒト赤血球表面にフィブリノーゲンを固相化したもの (Agam, G. and Livne, A. A. Eur. J. Clin. Invest. 22, 105-112 (1992))、ヒト赤血球表面にRGD配列を持つペプチドを共有結合させたもの (Coller, B. S. et al. J. Clin. Invest 89, 546-555 (1992))、可溶化血小板膜蛋白質を固相化したリボソーム (Rybak, M. and Renzulli, L. A. Biomat. Art. Cells and Immob. Biotech. 21, 101-118 (1993))、ヒト血小板を破壊、加熱処理後乾燥させたもの (Goognough, L. T. et al. Blood 86 (Suppl. 1), 610a (1995))、アルブミン粒子の表面にフィブリノーゲンを共有結合させたもの (Yen, R. C. K. et al. Transfusion 35, 41s (1995))、遺伝子組換えGP I b α を固相化したリボソーム (Kitaguchi, T. et al. Int. J. Haematol. 63 (Suppl. 1), 301 (1996))などが報告されているが、実用化には至

っていない。一方、これまでのところ、精製したインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を血小板代替物の用途に用いる可能性は示されていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前記のように、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ を生理的条件下で活性を保ったまま単離する方法は報告されていなかった。従って、その医薬用途についても検討された報告はなかった。また、血小板の人工的な代替物の必要性が高まっているにもかかわらず、満足のできるものは得られていなかった。本発明はかかる従来技術の欠点を改良し、単離した細胞外マトリックスレセプターを構成成分とする血小板代替物を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

前記課題を達成するため、本発明の血小板代替物は下記の構成からなる。

【0008】

すなわち単離した細胞外マトリックスレセプターを構成成分とする血小板代替物である。本発明者らはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を構造的に安定に会合させて単離することに成功し、これが生理条件下および血漿成分存在下に細胞外マトリックスに結合することを見出した。これによりインテグリン $\alpha 2\beta 1$ 、ひいては細胞外マトリックスレセプターの血小板機能代替物としての用途を見出したものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明で述べる細胞外マトリックスレセプターとは、インテグリンファミリーに属する一連の分子群をさす。さらに、インテグリンファミリーのうち、インテグリン $\beta 1$ ファミリー (Corliss, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)、Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. 37, 696-701 (1996)) に属し、 α 鎖として $\alpha 2$ であることが好ましい。

【0010】

本発明においては、細胞外マトリックスレセプターを単離して用いることが好

ましい。単離するためのレセプターソースとしては、細胞外マトリックスレセプターを発現する組織や細胞、遺伝子組み換え法により作製したレセプター発現細胞の膜分画の溶解物などが利用できる。より好ましくは、遺伝子組み換え法によりレセプター遺伝子に変異を加えて可溶化体となるように設計し、これを産生する細胞の培養上清をソースとして使用する。さらに、可溶化体を設計する上では、細胞外マトリックスレセプターのヘテロダイマー構造が維持されるようにすることが好ましい。例えば、ヘテロダイマー構造を、 α 鎖と β 鎖を共有結合などにより会合できるように改変し、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と免疫グロブリンのキメラ分子として用いることが望ましい。

【0011】

以下、本発明の細胞外マトリックスレセプターを代表例であるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と免疫グロブリンのキメラ分子を中心に説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0012】

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と免疫グロブリンとのキメラ分子とは、蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリン分子が並ぶようなキメラ蛋白質であることが望ましく、インテグリン $\alpha 2$ または $\beta 1$ の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。さらに、 $\alpha 2$ と $\beta 1$ のいずれの場合にも免疫グロブリンの重鎖と結合したキメラ蛋白質が好ましい。

【0013】

また $\alpha 2$ あるいは $\beta 1$ と結合させる免疫グロブリンのアイソタイプは、IgG、IgM、IgA、IgEも利用できるが、IgGを用いることが好ましい。IgGのサブクラスとしては、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄があるが、IgG₁を用いるのが好ましい。さらに免疫グロブリンの代わりに分子間にジスルフィド結合を有するダイマー構造の分子を利用することも可能である。

【0014】

本発明では、インテグリンの $\alpha 2$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの $\beta 1$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなる

キメラ蛋白質が会合してなる分子をインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と呼ぶ。このとき $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖($\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様)と $\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖、 $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖と $\beta 1$ ・免疫グロブリン軽鎖、 $\alpha 2$ ・免疫グロブリン軽鎖と $\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖の組合わせが考えられる。これらのどの組合わせでもよいが、好ましくは $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖と $\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖の組合わせがよい。

【0015】

以下にインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製方法を述べるが、これに限定されるものではない。

【0016】

インテグリンの $\alpha 2$ および $\beta 1$ を暗号化するDNAを得るには、公知のcDNA配列の情報を利用して、PCR法による遺伝子増幅、cDNAクローニング、DNA合成などの方法を利用しうる。例えば $\alpha 2$ および $\beta 1$ のDNA配列はすでに文献に報告されている(Takada, Y. et al. J. Cell. Biol. 109, 397-407 (1989)、Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987))。

インテグリンの $\alpha 2$ と $\beta 1$ を暗号化するDNAを得る別の方法として、抗体を利用する発現クローニングなども利用しうる。免疫グロブリンの定常領域を暗号化するDNAと結合するためには、インテグリンの $\alpha 2$ と $\beta 1$ の細胞外部分のみを暗号化するDNAを取り出すことが望ましい。そのためには、PCR法およびDNA合成法を用いることが好ましい。ここでいう細胞外部分とは、 $\alpha 2$ と $\beta 1$ いずれの場合にも膜貫通部分と予想されている部分よりN末端側のポリペプチド配列を指す。細胞外マトリックスとの結合能が維持されればその部分配列を用いることも可能であるが、細胞外領域と考えられている部分の大部分を用いることが好ましい。DNAを取り出す際には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結した後にフレームがあうように調整を加えておく必要がある。例えば、PCR法によりDNA断片を取り出す場合にはプライマーに変異を加えることによりこれを達成しうる。この場合、プライマーの塩基置換によりアミノ酸変異がおきないように設計することが望ましい。ただしキメラ蛋白質の機能に変化を与えない範

囲でのアミノ酸置換は許容しうる。化学合成によりDNAを得る場合には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結し得るように配列を設計しておくことで目的を達する。cDNAの場合には、DNAの切断と合成DNAを利用して、免疫グロブリンを暗号化するDNAと結合できるDNAを調製しうる。

【0017】

次に免疫グロブリンを暗号化するDNAを調製する。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖を暗号化するDNAを用いることが望ましいが、他の動物種の免疫グロブリンを暗号化するDNAも利用しうる。ヒト免疫グロブリンを暗号化するDNAの調製例はすでに報告されているが (Ellison, J. W. et al. *Nucleic Acids Res.* 10, 4071-4079 (1982)、Martin, T. et al. *Eur. J. Immunol.* 22, 1773-1779 (1992))、これに限定されるものではない。前述のインテグリン $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ を暗号化するDNAの調製と同様の方法を利用してもよい。本発明においてはヒト免疫グロブリンを重鎖として、ゲノムDNAを用いることが好ましいが、cDNAを用いてもよい。ヒト免疫グロブリン重鎖のDNAとしては、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域を暗号化する部分を用いることが好ましいが、CH1~CH3の定常領域全体を暗号化するDNAを利用してもよい。免疫グロブリン軽鎖の場合にはCL領域を暗号化するDNAを用いる。最終的に $\alpha 2$ あるいは $\beta 1$ の細胞外部分を暗号化するDNAとヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域を暗号化するDNAをフレームをあわせて連結する。得られたDNAは翻訳開始のメチオニンに始まって、インテグリンの $\alpha 2$ または $\beta 1$ のシグナル配列、その細胞外領域、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域をこの順に連結したポリペプチドを暗号化する。

【0018】

上記で得られたインテグリンの $\alpha 2$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、あるいはインテグリンの $\beta 1$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、をそれぞれ適当な発現制御配列に機能的に連結し、組換えベクターを得る。組換えベクターの作製方法、細胞への導入方法、など一般的な遺伝子組換えに関する方法は成書に記載されているが ("Molecular Cloning" Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Horbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。本発明においては、動物細胞での蛋白質発現、あるいは昆虫細胞での蛋白質発現に適した発現制御配列を用いることが望ましい。例えば、動物細胞発現では、SR α プロモーター、サイトメガロウイルス由来プロモーター、シミアンウイルス40由来プロモーターなどが、昆虫細胞発現では、ポリヘドリンプロモーター、p10プロモーターなどが発現制御配列として一般的に用いられているが、これらに限定されるものではない。本発明においてはSR α プロモーターを用いることが好ましい。

【0019】

得られた組換えベクターを細胞に導入することにより、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体産生細胞を得る。このとき、動物由来細胞または昆虫細胞などを宿主として用いることが好ましい。たとえば、COS細胞（サル腎臓細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、Sf9（昆虫細胞）などが宿主として一般的に利用されている。また、P3U1やY3などのミエローマ細胞を用いてもよい。その他の株化細胞やクローン化細胞も利用しうるが、これらに限定されるものではない。本発明においては、CHO細胞を用いることが好ましい。

【0020】

細胞に組換えベクターを導入する方法としては、リポフェクチン法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などが知られており、いずれの方法を用いてもよい。ただしこれらに限定されるものではない。組換えベクターを用いて細胞を形質転換する際に、インテグリンの $\alpha 2$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組換えベクター、およびインテグリンの $\beta 1$ と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組換えベクター、を薬剤耐性マーカーを変えて順次細胞に導入することが好ましい。導入はどのような順序で行ってもかまわない。また、同時に導入してもよい。導入する2種の組換えベクターとしては、 $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖（ $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様）と $\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖、 $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖と $\beta 1$ ・免疫グロブリン軽鎖、 $\alpha 2$ ・免疫グロブリン軽鎖と

$\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖の組合わせを発現するベクターがよい。これらのどの組合わせでもよいが、好ましくは $\alpha 2$ ・免疫グロブリン重鎖と $\beta 1$ ・免疫グロブリン重鎖を発現する組換えベクターの組合わせがよい。

【0021】

いずれの形質転換方法、ベクターの組合わせによっても、同時に2種の組換えベクターで形質転換され、しかも $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質を同時にほぼ同量、産生している細胞を選別することが重要である。これは、組換えベクターで形質転換された細胞の培養上清中の $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の産生量を測定することで達成できる。測定方法としては、例えば公知の方法に従って形質転換細胞を ^{35}S -メチオニンを含む培地で培養することにより蛋白質をラベル化した後、培養上清中の $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量をそれぞれの抗 $\alpha 2$ 抗体または抗 $\beta 1$ 抗体を用いる免疫沈降により推定することができる。他の方法としては、抗ヒト免疫グロブリン抗体と抗 $\alpha 2$ 抗体または抗 $\beta 1$ 抗体を用いるELISA法によって培養上清中の $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量を推定することができる。いずれにしても培養上清中への $\alpha 2$ および $\beta 1$ のキメラ蛋白質の産生量がほぼ同量で、多量に産生しているクローンを選別することがインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製のためには好ましい。蛋白質のラベル化方法、免疫沈降の方法、ELISAの一般的方法は成書に記載されているが("Antibodies" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。またキメラ蛋白質の検出のための他の方法も利用しうる。

【0022】

得られた形質転換細胞を一般的な細胞培養の方法に従って培養し、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生させることができる。培地として、低免疫グロブリン濃度の血清を5%程度含む培地が好

ましいが、一般に知られている血清含有培地や無血清培地でもよい。細胞を培養後、遠心分離などの操作により細胞および固形物を除去し、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清を回収する。

【0023】

この培養上清中には $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質と $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質がヘテロダイマー複合体を形成したインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質だけでなく、ヘテロダイマー複合体を形成していない $\alpha 2$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および $\beta 1$ と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質が混入していると推定できる。しかし、ヘテロダイマー複合体以外の分子は強い細胞外マトリックスへの結合能を持たないことから、この培養上清を細胞外マトリックスまたは細胞との結合の試験、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と細胞外マトリックスの結合を阻害する物質の探索、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ に結合する物質の探索、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の細胞外マトリックス量を測定する試薬、として利用することができる。これらの利用方法は、後述する精製したインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いる場合と基本的には同じである。

【0024】

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は、免疫グロブリン部分の性質を利用してプロテインAカラム担体を用いる定法に従って達成できる。また、 $\alpha 2$ または $\beta 1$ に対する抗体を用いる親和性クロマトグラフィーの手法を利用してもよい。さらに、細胞外マトリックスを担体に結合した親和性クロマトグラフィーの手法により精製することもできる。一般的なクロマトグラフィーの方法を組合わせて精製することもできる。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 分子をこれらの方法で精製した公知例 (Kirchhofer, D. et al. J. Biol. Chem. 265, 615-618 (1990)、Staatz, W.D. et al. J. Cell. Biol. 108, 1917-1924 (1989)、Santro, S.A. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 217-223 (1988)など) を応用すれば、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は達成できる。

【0025】

精製したインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、SDS-PAGEにより非還元下で1本のバンドを示し、還元下で2本のバンドを示す蛋白質として同定できる。また、これによりヘテロダイマーが免疫グロブリン重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを確認できる。さらに、それぞれのバンドがキメラ蛋白質であることは、ウエスタンブロッティングなどの方法により確認できる。別の方法として、得られた分子がインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることは、前述の抗 $\alpha 2$ 抗体、抗 $\beta 1$ 抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を組合わせたELISAにより確認できる。つまりすべての抗体に対するエピトープを持つ蛋白質分子として同定できる。さらに別の方法として、免疫沈降によってインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を同定することもできる。この場合には、精製した蛋白質を公知の方法を用いて ^{35}S または ^{125}I またはビオチンなどでラベル化した後、抗 $\alpha 2$ 抗体、抗 $\beta 1$ 抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて免疫沈降するといずれの場合にも同じ電気泳動パターンが得られることで、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が目的とする構造をとっていることを確認することができる。さらに、細胞膜上のインテグリン複合体が解離する条件、例えばEDTAの共存や、SDSの存在下での煮沸などの操作を加えても免疫沈降パターンが変化しないことから確認できる。インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の確認方法はこれらによって限定されるものではない。

【0026】

調製したインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の細胞外マトリックスへの結合能は以下のように試験することができる。細胞外マトリックスとインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を接触させて混合物を作製した後に、細胞外マトリックスに結合したインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の量またはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合した細胞外マトリックス量を測定する。インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -

免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量の測定は、複合体自身を蛍光色素または酵素またはラジオアイソトープなどで標識しておくことで行うことができる。細胞外マトリックス量の測定も同様の手法で行うことができる。SPA（アマシャム社）のような検出方法を利用して測定することもできる。さらに、蛍光色素、酵素、ラジオアイソトープなどで標識した複合体または細胞外マトリックスを認識する試薬を利用して測定することもできる。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、例えば抗ヒト免疫グロブリン抗体がある。本試験においては、検出される分子を何らかの担体、例えばビーズやプレート、に結合させておくことが好ましい。また、細胞外マトリックスは分子全体だけでなく、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ との結合活性を保持する一部分を取り出して使用することもできる。例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンやそのペプチド断片を担体に結合させて使用することができる。

【0027】

精製したインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬用途を確認するためには、精製した蛋白質そのものを用いて薬理活性を調べる。より好ましくは、細胞外マトリックスへのより高い結合能を得るために、脂質などからなる担体に結合させて用いるが、これには限定されない。

【0028】

本発明においては、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、既報（Martin, F.J. et al. Biochemistry, 20, 4229 (1981)）の方法に準じて、リボソームに共有結合させて用いることが好ましい。担体としては、リボソーム以外のどのような薬物担体でも、医薬品用途が容認されるものであればよい。リボソーム担体を用いる場合、成書（リボソームの作製と実験法、奥 直人（1994）、廣川書店）にある組成、方法を用いてリボソームを作製するが、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の細胞外マトリックスへの結合エピトープがリボソーム膜の外側に露出する方法が好ましい。

【0029】

ここで調製したリポソーム担体上に、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認する方法として、フローサイトメーターを使用する。インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体などを利用することができる。利用する抗体が、蛍光標識されている場合はそのまま測定に供するが、蛍光標識されていない場合には、抗体を作製した動物種の免疫グロブリンクラスを認識する2次抗体の蛍光標識体を用いて行う。これ以外の確認方法として、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体自身を酵素またはラジオアイソトープなどで標識し、発色色素や放射活性測定装置などとの適切な組み合わせによって確認することも可能である。

【0030】

インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを用いて細胞外マトリックス結合能を調べるには、生理的な陽イオン濃度を含む緩衝液中または血漿中にインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを懸濁して用いることが好ましい。ここで言う生理的な陽イオン濃度を含む緩衝液とは、少なくとも、Mgイオン、Caイオンのような陽イオンを含み、中性付近に調整されたものを言う。また、血漿は、抗凝固剤の存在下で採血し、一般的な血漿作製法にて調製する。たとえば、抗凝固剤としてヘパリンやEDTA溶液を十分な単位数加えて用いることができる。市販されている正常血漿、凝固因子欠乏血漿や血清などを用いてもよい。ただし、使用する抗凝固剤により陽イオン濃度が低下する場合、後に生理的な濃度になるように陽イオンを添加して使用する。次に、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを、担体に固相化した細胞外マトリックスあるいはその一部の断片と一定時間混合して結合の有無を判定する。細胞外マトリックスあるいはその一部の断片の固相化は、プラスチックプレートなどを用いて行うことが好ましいが、市販の細胞外マトリックス固相化ビーズなどを用いてもよい。細胞外マトリックスとして、コラーゲンを用いる場

合、どのような動物種およびタイプを用いてもよい。インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームと細胞外マトリックスとの結合反応は、血小板の粘着反応をみるのに一般的な方法に準じて行う。多くの場合は、主に静止系で一定時間放置し、マトリックスへの結合を誘導するが、好ましくは、振とう負荷、ずり応力などを加える。

【0031】

インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、上述のような条件下で細胞外マトリックスに結合するが、この結合量は、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いる上述のELISA法を応用して測定する。より正確な定量のためには、マトリックスに結合したリポソームを1%グルタルアルデヒドなどにより固定しておくことが望ましい。また、ELISA法以外に、たとえば放射標識した脂質をリポソームにあらかじめとりこませておけば、細胞外マトリックスに結合したリポソーム量を放射活性として求めることもできる。さらに、細胞外マトリックスへの結合および被覆度を定性的に判断するには、結合したリポソーム上のインテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質を認識する標識抗体と発色色素などを組合わせ、リポソームが結合している部分を染色することができる。より好ましくは、一般的に使用される組織抗体染色の方法を利用し、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ -免疫グロブリンに対するペルオキシダーゼ標識抗体とジアミノベンチジンを組合わせるが、この方法に限定されない。他の方法として、細胞外マトリックスを被覆した面積を、画像処理解析装置を用いて被覆率を求めてもよい。

【0032】

血小板の止血機能検査として、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能、コラーゲンにより誘導される凝集能をみる方法がある（「血液凝固検査ハンドブック」p65-78、福武勝博、藤巻道夫（1987） 宇宙堂八木書店、Santoro, S.A. Cell, 46, 913-920 (1986)、Lethagen, S. and Rugarrn, P. Thrombo Haemost, 67, 185-186 (1982)）。特に、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能の高さが、一次止血能の高さの指標となる。この粘着能の評価は、血液をそのまま用いるか、もしくは多血小板血漿や生理イオン条件の緩衝液で洗浄した血小板を用いて行う。

従って、本発明で得られたインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームが血小板の機能代替物となりうるかどうかは、血漿成分存在下、あるいは生理的なイオン濃度条件下における細胞外マトリックスへの結合性の有無、結合性の高さで判断できる。

【0033】

本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームの血漿成分存在下における細胞外マトリックスへの強い結合性は、血小板代替物となりうることを示している。従って血小板異常による先天性および後天性の出血傾向に対する治療・予防薬として、広くは、血小板輸血代替物として使用できる。

同様にして、本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームは、血管内皮細胞障害が問題となる病態の治療・予防薬となりうる。例えば、PTCA（経皮的冠血管再狭窄）の予後においては、バルーンカテーテル処理により露出した細胞外マトリックスへの血小板の過剰集積が、再狭窄の引き金となることが報告されている（Liu, M.W. et al. Circulation, 79, 1374-1378 (1989)）。本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームの細胞外マトリックス被覆効果を利用すれば、血小板の過剰集積が軽減されるため、再狭窄予防薬としても利用しうる。また、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームを医薬用途で許容される方法で標識すれば、血管内皮細胞障害により露出した細胞マトリックス露出部位のモニタリングに利用できるほか、リボソーム内への薬剤封入により、障害部位局部へのターゲティング療法へも応用できる。このほか、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は、癌転移への関わりが報告されており、癌転移予防薬として利用できる可能性がある。

【0034】

本発明で示されるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームの投与経路としては、輸液注入もしくは静脈内投与などが挙げられ、通常、塩溶液または血漿などの生理学的に適合する溶液に懸濁して用いられる。また、単独でも全血小板を含む他の薬剤と一緒に用いてもよい。

投与量は症状、年齢、体重等に応じて適宜選択されるが、成人に対して、蛋白質量として1日0.1mg~10gであり、1回または数回に分けて投与することができる。また、薬学的に許容される担体、賦形剤などと混合し、軟膏剤、塗布剤、貼付剤などの外用剤として障害部位へ局所的に投与することも可能である。この場合には1回塗布あたり蛋白質量として1ng/cm²~1mg/cm²となるように調製される。

【0035】

以下に発明の詳細を実施例を用いて示す。

【0036】

【実施例】

実施例1

ヒトIgG₁重鎖発現ベクターの作製

ヒトIgG₁ゲノム遺伝子は、報告された塩基配列情報 (Ellison, J. W. et al. Nucleic Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)) に基づくハイブリダイゼーションcDNAプローブを用い、ヒトゲノムライブラリー (CLONTECH) から上述の配列情報に一致するクローンを取得した。これをPCRの鋳型DNAとした。ヒトIgG₁遺伝子のヒンジ領域 (H) と定常領域部分 (CH2とCH3) を含むDNA断片を増幅するためのプライマーとして配列表の配列番号1 (以下、配列表の配列番号を、配列番号と略す) および2に示すDNAオリゴマーをBamHIおよびXbaI制限サイトを挿入して合成した。

【0037】

5' -GCGGATCCCGAGCTGCTGGAAGCAGGCTCAG-3' (配列番号1)

5' -CCTCTAGACGGCCGTCGCACTCATTTA-3' (配列番号2)

【0038】

鋳型DNA、プライマー、dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP等モル混合液)、Taqポリメラーゼ (Takara) をPCR緩衝液 (10mM Tris-HCl、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.01% gelatin pH8.3) 中で混合したの

ち、サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus) にて、DNA 変性を 94℃ で 1 分、プライマーのアニーリングを 58℃ で 2 分、プライマーの伸長を 72℃ で 3 分を 30 サイクル行った。増幅した DNA を制限酵素 BamH I および Xba I で消化後、常法 ("Antibodies" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従い、1% アガロースゲルにて DNA 断片を精製した。これを制限酵素 BamH I および Xba I で消化して精製した p Bluescript SK (+) (STRATAGENE) の大 DNA 断片と T4 DNA リガーゼを用いて連結した。このプラスミド DNA を用いて大腸菌 (JM109) を形質転換し、形質転換株を選択してプラスミド DNA (IgG₁ Bluescript) を得た。次に、発現ベクター pcDL-SR α 296 を制限酵素 BamH I で消化後、T4 DNA ポリメラーゼ処理にて平滑端とし、Not I リンカーを連結した。これを、制限酵素 Not I および Xho I 消化した大 DNA 断片と IgG₁ Bluescript を制限酵素 Not I および Xho I 消化した小 DNA 断片を常法に従って精製し、両 DNA 断片を T4 DNA リガーゼで連結した。これを大腸菌 (HB101) に形質転換した後に形質転換株を選択してプラスミド DNA を得た。以下、該プラスミド (IgG₁ SR α) をヒト IgG₁ 発現ベクターと呼ぶ。なお、以後の実施例で述べる遺伝子組換えの基本的な操作は上記と同様であるので簡略に述べる。

【0039】

実施例 2

インテグリン α 2 · IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン α 2 の細胞外部分を暗号化する DNA 断片は、既報の cDNA 配列情報 (Takada, Y. et al. J. Cell. Biol. 109, 397-407 (1989)) をもとに、 α 2-1 と α 2-2 に分割してサブクローニングし、発現ベクター上で 1 本化した。まず、インテグリン α 2 発現細胞であるヒト線維芽細胞株 MRC-5 (ATCC CCL 171) の RNA を分離し、オリゴ dT セルロースカラムを用いて PolyA (+) RNA を精製した。これをもとに 1 本鎖 cDNA を合成し、PCR の鋳型として使用した。PCR プライマーとして、 α 2-1 は配列番号 3 と 4、 α 2-2 は配列番号 5 と 6 の DNA オリゴマーを合成して使用した。

【0040】

5' -GCTCGAGCAAACCCAGCGCAACTACGG -3' (配列番号3)

5' -ATAGTGCCCTGATGACCATTG -3' (配列番号4)

5' -GATGGCTTTAATGATGTGATTG -3' (配列番号5)

5' -TGTTGGTACTTCGGCTTTCTC -3' (配列番号6)

【0041】

鋳型cDNAとプライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合後、サーマルサイクラーにて、PCR（反応条件：94℃1分-60℃2分-72℃3分）を30サイクル行った。増幅した $\alpha 2-1$ のDNA断片は、制限酵素Xho IおよびEcoR Iで消化して精製し、 $\alpha 2-2$ のDNA断片はT4 DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素EcoR Iで消化して精製した。精製した2つのDNA断片をリン酸化反応液（50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、25 mM DTT、1 mM ATP、0.1 U/ μ l T4ポリヌクレオチドキナーゼ（Takara）pH 8.0）中で37℃、1時間反応後、68℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。次に、実施例1で作製したIgG₁SR α を制限酵素Bam HIで消化後、Klenow反応液（66 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.2 mM dNTPs、0.05 U/ μ l Klenow fragment（Takara）pH 7.5）中で37℃、30分間反応させて末端を平滑化し、70℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。さらに制限酵素Xho Iで消化し、大DNA断片を精製した。この大DNA断片に、先にリン酸化した2つ（ $\alpha 2-1$ 、 $\alpha 2-2$ ）のDNA断片を挿入し、プラスミドDNAを得た。以下該プラスミド（インテグリン $\alpha 2$ ・IgGSR α ）をインテグリン $\alpha 2$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

【0042】

実施例3

インテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン β 1発現細胞株として、ヒト繊維芽細胞株MRC5 (ATCC CCL 171) のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムを用いてPoly A (+) RNAを精製した。これをもとに逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。プライマーとして、配列情報 (Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987)) に従い、C端を暗号化する側にBamH I制限サイトを挿入するように配列番号7および8の2本のDNAオリゴマーを合成した。

【0043】

5' -GCGGAAAAGATGAATTTACAAC-3' (配列番号7)

5' -GTGGGATCCTCTGGACCAGTGGGACAC-3' (配列番号8)

【0044】

鋳型cDNA、プライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA変性を94℃で1分、プライマーのアニーリングを57℃で2分、プライマーの伸長を72℃で3分を30サイクル行った。増幅したDNAを、T4 DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素BamH Iで消化後DNA断片を精製した。次に、pBlue script KS (+) のSma IおよびBamH Iサイトに、先のPCRで得たDNA断片をサブクローニングした。さらにこれを、制限酵素EcoRIおよびBamH Iで消化して精製した小DNA断片を、制限酵素EcoR IおよびBamH I処理したIgG₁SR α の大DNA断片に挿入し、プラスミドDNAを得た。以下該プラスミド (インテグリン β 1・IgGSR α) をインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

【0045】

実施例4

インテグリン α 2・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン β 1・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

ジヒドロ葉酸リダクターゼ欠損CHO細胞(ATCC CRL 9096)を10%FBS(GIBCO)添加 α MEM培地(核酸含有、GIBCO BRL)にて培養し、DNAの移入前に、Opti-MEM I培地(FBS不含、GIBCO BRL)に置換した。この細胞に、インテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgGSR}\alpha$ とpSV2dhfr(BRL)を10:1の割合で混合したものを、リポフェクチン試薬(GIBCO BRL)を用いて形質移入した。移入3日後に、細胞をトリプシン-EDTA処理にて分散後、96ウェルプレート(CORNING)に播種し、10%FBS添加 α MEM培地(核酸不含、GIBCO BRL)中でdhfrが形質移入された細胞を10日間選択培養した。その後、培養上清中に産生されるインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、もっとも高い産生量を示すクローンを限界希釈法によるクローニングにより安定化した。

【0046】

次に、安定化したインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質産生CHO細胞を培養し、同様にOpti-MEM I培地に置換した。この細胞に、インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgGSR}\alpha$ とpSV2neo(BRL)を10:1で混合したものを、リポフェクチン試薬を用いて形質移入した。移入3日後に、細胞をトリプシン-EDTA処理にて分散後、96ウェルプレートに播種し、10%FBSとneomycin(1mg/ml、GIBCO BRL)を添加した α MEM培地(核酸不含)中でneoが形質移入された細胞を約10日間選択培養した。その後、培養上清中に産生されるインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、両キメラ蛋白質の産生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するクローンとして安定化した。

【0047】

実施例5

ELISA法によるインテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質およびインテグ

リンβ1・IgG重鎖キメラ蛋白質産生量の測定

抗ヒトインテグリンα2抗体 (Becton&Dickinson、クローンP1E6)、または抗ヒトインテグリンβ1抗体 (Coulter、クローン4B4) 2μg/mlを96穴イムノプレート (NUNC) に50μl/ウェルずつ入れ、4℃、16時間静置した。その後、各ウェルをPBS (-) にて2回洗浄し、25%ブロッケース (雪印乳業) 含有PBS (-) にて非特異反応をブロックした。ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、0.02% Tween 含有PBS (-) (以下T-PBS) で2回洗浄した。次にビオチン化抗ヒトIgG抗体 (Vector) と1時間反応後、T-PBSで2回洗浄し、続いてアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (Sigma) と1時間反応後、PBS (-) で2回洗浄した。PBS (-) を完全に吸引したのち、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダー (Bio-rad NOVAPATH) を用いて490nmの吸光度を測定し、高い吸光度を示すクローンを選択した。

【0048】

実施例6

α2・IgG重鎖-β1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製

(1) CHO細胞の培養と培養上清の調製

α2・IgG重鎖-β1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高産生するCHO細胞を、5%FBS (Ultra-low IgGグレード) を含むαMEM (-) 培地で1日培養し、セミコンフルエントとなった細胞を1%FBS (Ultra-low IgGグレード) を含むαMEM (-) 培地に交換して3日間培養したのち、培養上清を回収した。これを限外濾過により1/10容量まで濃縮し、最終濃度5mMとなるように1M HEPES溶液 (pH 8.0) を加えて精製原液とした。

【0049】

(2) プロテインAカラムクロマトグラフィー

精製原液を、Prosep Guard担体カラムを通過させたのち、Prosep A担体カラムにアプライした。アプライ終了後、カラム体積の10倍容量のPBS(-)で洗浄し、続いて0.1Mクエン酸緩衝液pH 6~3のグラジエントで蛋白質を溶出した。pH 3で溶出されるピーク画分を回収、1M Tris-HCl溶液(pH 8.5)を0.1容量加えて中和後、PBS(-)に対して透析した。

【0050】

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

報告(Kirchhofer, D. et al. J. Biol. Chem. 265, 615-618 (1990))に従ってコラーゲン(Type I, Sigma)をcyanogen-bromide-activated sepharose (Sigma)にカップリングさせたコラーゲン固定化カラムを作製した。次に、精製原液をTBS緩衝液(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂ pH 7.5)に平衡化したのち、カラムにアプライして室温で3時間静置したのち、カラム体積の10倍容量の洗浄緩衝液(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 100 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5)で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液(20 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 50 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5)を用いてカラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、PBS(-)に対して透析した。

【0051】

(4) SDS-PAGE

(3)の溶出画分を7.0%アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下でSDS-PAGEを行ったのち、ゲルをクマシー染色した。その結果、非還元下では、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられるバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質と考えられる2本のバンド(185 kDa、135 kDa)が認められた。これらの結果は、溶出蛋白質が、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造であり、しかもIgG重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

【0052】

実施例7

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

基本的な方法は成書 ("Antibodies" Harlow E. et al. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従った。すなわち、実施例6(3)で得たコラーゲンカラム担体からの溶出蛋白質をlactoperoxidase法を用いて ^{125}I ラベル化した。次に、Affigel-10 (Bio-rad) を0.1M HEPES溶液(pH 8.0)にて洗浄したのち、正常マウスIgG、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体(クローンP1E6)および抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(クローン4B4)を加えて4℃で16時間反応させて共有結合させ、正常マウスIgGビーズ、および各抗体ビーズを作製した。次に、先に ^{125}I 標識した溶出蛋白質を、正常マウスIgGビーズと4℃、4時間転倒混和してプレクリアーしたのち、抗体ビーズと4℃、16時間転倒混和した。混和後、ビーズを洗浄緩衝液(0.2M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1% NP-40, 1mM MgCl_2 または10mM EDTA pH 8.0)にて3回洗浄した。洗浄後、ビーズに電気泳動用サンプルバッファーを加えて100℃で5分間処理し、遠心分離した後の上清を還元下で電気泳動した。泳動後、ゲルドライヤーにてゲルを乾燥させ、蛋白質をオートラジオグラフィーにて検出した。

【0053】

その結果、1mM MgCl_2 または10mM EDTA存在下のいずれにおいても、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体の両ビーズから、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。この結果は、コラーゲンカラム担体の溶出蛋白質が確かに $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例6(4)のSDS-PAGEの結果とあわせて、両蛋白質の会合がIgG重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

【0054】

実施例 8

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のコラーゲンへの結合性と特異性の検討

コラーゲン (Cell matrix Type I 3 mg/ml) を 0.02 M 酢酸溶液で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように希釈し、96穴イムノプレートに 100 μl /ウェル入れて 4℃、16 時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS (-) で 2 回洗浄して中和し、熱変性 1% BSA-PBS 溶液を 300 μl /ウェル入れ、室温で 3 時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS (-) で 2 度リンスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

【0055】

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む CHO 培養上清 (100 μl) を 30℃、3 時間反応させた。反応後、非結合 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、0.1% BSA 含有 TBS 緩衝液 (150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl、1 mM MnCl_2 pH 7.4) で 2 回洗浄除去し、結合した $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、1 次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体、2 次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと反応させた後、TBS 緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後 490 nm で吸光度を測定した。

【0056】

図 1 にその結果を示す。 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とコラーゲンの結合を示す吸光度の上昇が認められた。この結合は、各 10 $\mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体 (クローン P1E6) と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体 (クローン 4B4) の共存下、および 5 mM EDTA の存在下ではほぼ完全に阻害された。この結果は、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面に存在するインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と同様にコラーゲンへの結合性をもつことを示している。また、この結合がインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ に特異的であること、陽イオン依存性であることが明

らかとなった。

【0057】

実施例9

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームの作製

Martinらの方法 (Martin, F.J. et al. Biochemistry. 20, 4229, (1981))に従ってリボソームを作製した。まず、ジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE, Sigma) に二架橋試薬Nスクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SDPD, Sigma) を用いて活性化SH基を導入し、ピリジルジチオプロピオニルジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (PDP-DPPE) を作製した。このPDP-DPPEと、ジパミルトイルホスファチジルコリン (DPPC)、コレステロールを混合して脂質フィルムを調製したのち、ソニケーターにて処理し、濾過フィルターを用いて粒径の均一なリボソームを得た (PDP-DPPEリボソーム)。次に、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と、陰性コントロールとして用いるヒトIgG (Cappel) をHepes緩衝液 (100mM Hepes, 150mM NaCl pH8.0) に溶解し、SDPDを加えて30分間反応させた後、反応液をPD-10カラム (ファルマシア) にアプライし、0.1M酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) で溶出した。溶出液に、ジチオスライトールを加えて20分間処理後、再度PD-10カラムにアプライし、Hepes緩衝液 (100mM Hepes, 150mM NaCl pH8.0) で溶出し、SDPD修飾 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を得た。このSDPD修飾したヘテロダイマー複合体とPDP-DPPEリボソームを室温で24時間反応させ、セファロース4Bカラム (Sigma) で分離し、ピーク分画から $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームを得た。

【0058】

リボソーム上の $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量は、SDS-PAGE/クマシー染色後、デンストメーター (ATTO) により定量し、最終濃度1mg/mlとした。

【0059】

実施例10

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのフローサイトメトリー解析

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを1mMEDTA含有PBS(-)に分散したのち、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体(クローンP1E6)または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(クローン4B4)と室温で30分間反応させた。反応後、15000rpmで10分間遠心分離し、1mMEDTA含有PBS(-)で洗浄後、同溶液に再度懸濁した。これに、2次抗体として、FITC標識抗マウスIgG抗体(Cappel 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を入れて室温で30分間反応させた。反応後、同様に遠心分離により洗浄し、フローサイトメトリー(ELITE、Coulter)にて測定した。

【0060】

その結果、両抗体に対する陽性反応を確認し、リポソーム上に $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認した。

【0061】

実施例11

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合活性

コラーゲン(Cell matrix TypeI 3mg/ml)を0.02M酢酸溶液で希釈し、イムノプレートに100 μl /ウェル入れ、4℃、16時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS(-)で2回洗浄して中和し、熱変性1%BSA-PBS溶液を300 μl /ウェル入れ、室温で3時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS(-)で2度リンスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

【0062】

正常ヒト血漿(ジョージ・キング社)、およびフォンビルブランドファクター欠乏(シビアー)血漿(ジョージ・キング社)を抗ヒトIgG抗体とプロテイン

Aにより吸収処理したのち、PBS（－）に対して24時間透析し、含有されているクエン酸ナトリウムを除去した。使用時に、CaイオンおよびMgイオン濃度を血液中の生理的陽イオン濃度条件とするため、最終濃度CaCl₂を1.2mM、MgCl₂を0.2mMとなるように加えた。陽イオン濃度を調整したのちの正常ヒト血漿、およびフォンビルブランドファクター欠乏血漿にα2・IgG重鎖-β1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームまたはヒトIgGリポソームが1～100ng/ml蛋白濃度となるように懸濁した。この懸濁液をコラーゲンコートプレートに、100μl/wellずつ入れた。プレートを、プレートシェーカーを使用して100回転/分の振とう条件下、室温で15分間反応させた。反応後、非結合リポソームをPB液（1.2mM CaCl₂、0.2mM MgCl₂、1%BSA含有PBS、pH7.4）で洗浄除去し、1%グルタルアルデヒド-PBSで室温で30分間固定した。固定後、熱変性BSA-PBS溶液で室温1時間ブロッキングした。その後、実施例8に従って、1次抗体としてビオチン標識抗ヒトIgG抗体、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと反応させた後、TBS緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後490nmで吸光度を測定した。5mM EDTA 5mM、抗インテグリンα2抗体（クローンP1E6、10μg/ml）と抗インテグリンβ1抗体（クローン4B4、10μg/ml）共存下の効果を検討する際は、あらかじめリポソーム懸濁液と室温で15分間反応させた後、コラーゲンと反応させた。

【0063】

結果を図2および図3に示す。正常ヒト血漿中では、陰性コントロールとするヒトIgGリポソームのコラーゲンへの結合は見られないが、α2・IgG重鎖-β1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合は濃度依存的に増加した（図2）。フォンビルブランドファクター欠乏血漿を用いた場合も同等に結合した（図2）。さらに、正常血漿中にα2・IgG重鎖-β1・IgG重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを30ng/ml加えた場合に見られるコラーゲンへの結合は、陽イオンキレート剤であるEDTAおよび抗体の添加により完全に阻害された（図3）。この結果は、

生理的な陽イオン条件の血漿中において $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが血小板同様にコラーゲンに結合することを示しており、粘着血小板の代替物となりうることを強く示唆した。さらに、フォンビルブランドファクター欠乏血漿中でも同等の結合活性を示すことから、フォンビルブランド病などの凝固異常を伴う血漿中でも利用可能であることを示している。

【0064】

実施例12

$\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームによるコラーゲン被覆状態の解析

ラボテクチャンバースライド（インターメッド、8ウェル型、プラスチック製）のウェルの中央にコラーゲン溶液 $5 \mu\text{l}$ をスポットして16時間静置後、洗浄し、ブロッキング処理をした。次に、このスライドに、実施例11に準じて正常ヒト血漿に $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを 30 ng/ml 蛋白濃度となるように懸濁した。この懸濁液を $200 \mu\text{l/well}$ ずつ入れ、同条件で反応させた。反応後、非結合リポソームをPB緩衝液で洗浄除去し、固定後、ブロッキング処理した。次に、1次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させた後、TBS緩衝液で洗浄した。洗浄後、ジアミノベンチジンを加えて染色し、コラーゲン上に結合した $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの被覆状態を観察した。

【0065】

ヒト IgG リポソームでは、コラーゲンコート部の着色が認められないが、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームでは、コラーゲンコート部全体の着色が認められた。従って、 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、コラーゲンコート部分のみを被覆し、粘着血小板の代替物となることを強く示唆した。

【0066】

【発明の効果】

本発明により、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -IgGヘテロダイマー複合体が血小板の代替物として利用できることを見いだした。得られたインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -IgGヘテロダイマー複合体は、血小板減少症または血小板機能異常症などに伴う出血傾向の治療・予防薬として利用できる。さらに、細胞外マトリックスの露出部位のモニタリング試薬やターゲッティング療法にも利用できる。

【0067】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGATCCCG AGCTGCTGGA AGCAGGCTCA G

31

【0068】

配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGACGG CCGTCGCAC TCATTTA

27

【0069】

配列番号：3

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTCGAGCAA ACCCAGCGCA ACTACGG

27

【0070】

配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATAGTGCCCT GATGACCATT G

21

【0071】

配列番号：5

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATGGCTTTA ATGATGTGAT TG

22

【0072】

配列番号：6

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGTTGGTACT TCGGCTTTCT C

21

【0073】

配列番号：7

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGAAAAGA TGAATTTACA AC

22

【0074】

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGATCCT CTGGACCAGT GGGACAC

27

【図面の簡単な説明】

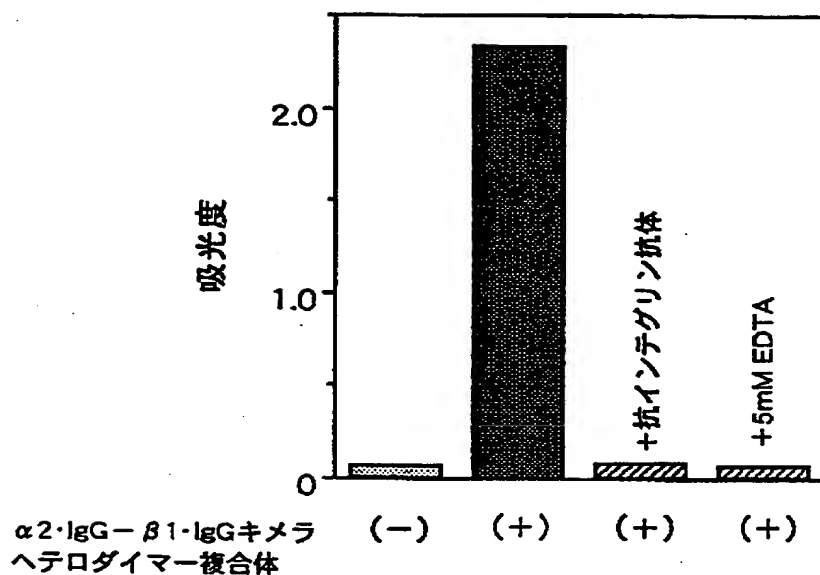
【図1】 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がコラーゲンに結合し、この結合が抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、陽イオンキレート剤である EDTA により阻害されることを示す。

【図2】 $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが、血漿存在下でコラーゲンに結合することを示す。

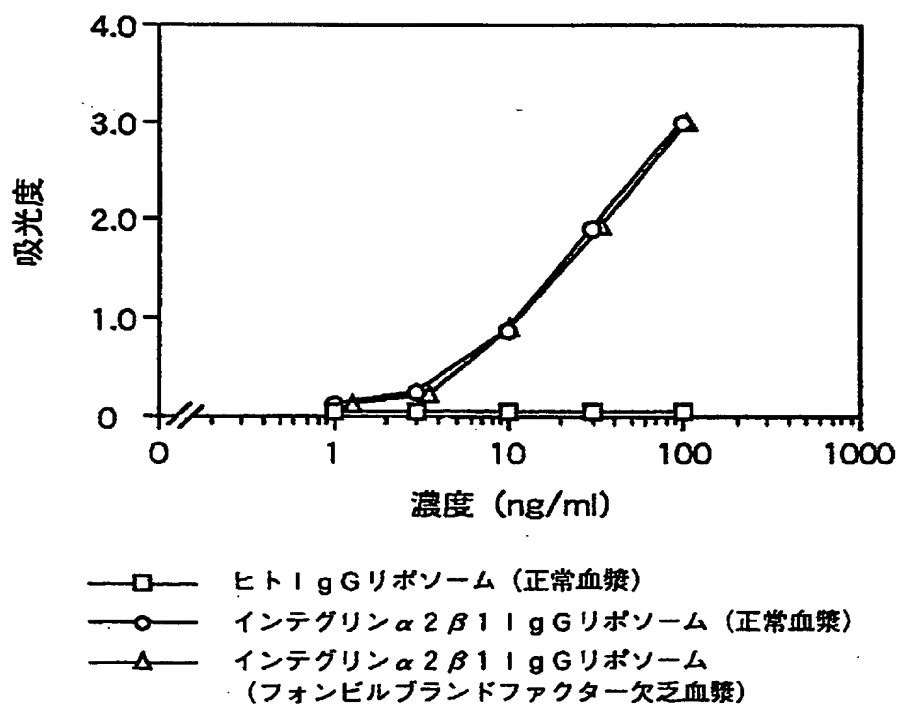
【図3】 血漿存在下における $\alpha 2 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合が、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、陽イオンキレート剤である EDTA により阻害されることを示す。

【書類名】図面

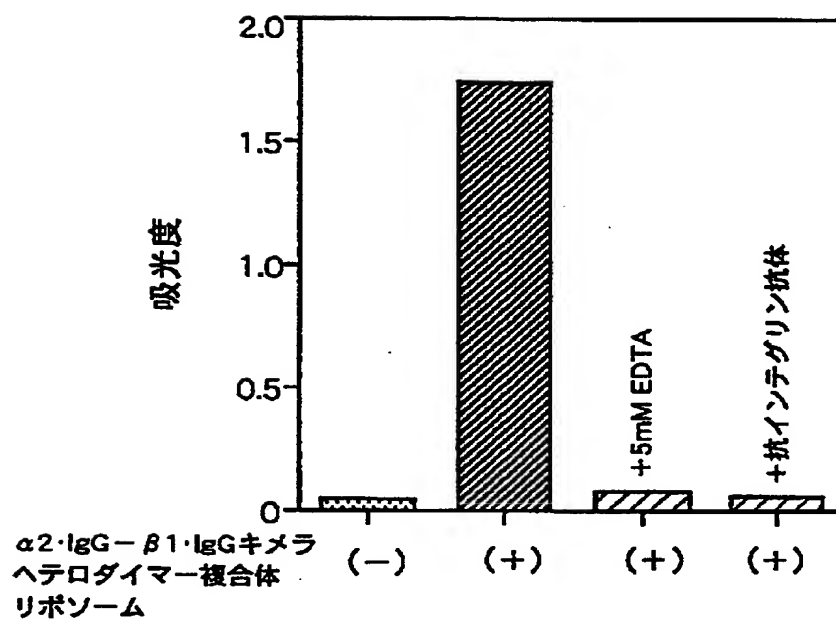
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【解決手段】

単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物。

【効果】

本発明により、単離した細胞外マトリックスレセプター、特にインテグリン α 2 β 1-IgGヘテロダイマー複合体が、血小板の粘着能を代替可能な血小板代替物として利用できることを見いだした。

【選択図】なし

特平 9-234544

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000003159

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

【氏名又は名称】

東レ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003159]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
氏 名	東レ株式会社